

Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts

Aufgrund der in den letzten Jahren immer mehr um sich greifenden Fälschungen von Markenprodukten oder der Manipulation von Informationen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Produkt stehen, z. B. Verfallsdaten von Arzneimitteln, besteht ein starkes Bedürfnis nach selektiven, schwer fälschbaren, schwer zu umgehenden oder zu manipulierenden, einfachen und schnell durchführbaren Verfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts oder mit dem Objekt in Zusammenhang stehender Informationen.

Im Stand der Technik sind bereits verschiedene selektive Verfahren zur Prüfung der Echtheit von Objekten bekannt.

So wird in WO 98/33162 ein selektives Verfahren zur Echtheitsprüfung von Objekten beschrieben, das auf der selektiven Wechselwirkung zwischen einem „print molecule“ und einem „molecularly imprinted molecule“ beruht. Bei diesem Verfahren wird die nachzuweisende Komponente („print molecule“) einem Polymer eingeprägt, das danach dreidimensionale Abdrücke („molecularly imprinted molecule“) des Moleküls enthält. Der Originalitätsnachweis beruht auf der (mehr oder weniger) spezifischen Erkennung des eingepägten Moleküls durch ein Polymer.

Aus EP-A-0327163, US-A-5,429,952 und WO 95/06249 ist jeweils die Verwendung spezifischer Antikörper im Rahmen eines Immunoassays zur Echtheitsprüfung bekannt. WO 87/06363 verwendet makromolekulare Testkomponenten, wie z. B. Proteine und Nukleinsäuren, zur Markierung von Produkten, wobei der spezifische Nachweis im Falle der Proteine mit markierten Antikörpern und im Falle der Nukleinsäure mit entsprechenden markierten Nukleinsäuresonden erfolgt.

Nachteilig an diesen Verfahren ist, dass die Bildung eines Komplexes durch zwei komplementäre Bindungspartner nicht direkt zu einem auswertbaren Signal führt und somit hintereinandergeschaltete Schritte, z. B. zur Abtrennung von nicht

spezifisch gebundenem Reagenz, für die Originalitätsprüfung notwendig sind, um ein spezifisches Signal zu erhalten.

Durch die verschiedenen Schritte werden die Analysen verlängert und die Kosten erhöht. Zudem ist bei einer Originalitätsprüfung, die instrumentenunabhängig, schnell und auch von ungeschulten Personen durchgeführt werden soll, ein rasches, einfaches und nicht fehleranfälliges Verfahren besonders erwünscht.

PCT/EP01/00764 beschreibt ein Nachweissystem zur Prüfung der Originalität, bei dem das Objekt z. B. mit einem Enzymsubstrat markiert wird und dieses dann in einer entsprechenden Testvorrichtung mit dem Enzym umgesetzt wird, wobei die Produkte der Umsetzung direkt oder nach Kombination mit einem Indikatorsystem ein nachweisbares Signal ergeben. Dieses Verfahren erlaubt die rasche Durchführung der Prüfung mit einer relativ einfach aufgebauten Testvorrichtung.

Demgegenüber besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, das Testverfahren noch weiter zu vereinfachen und die Testvorrichtung durch ein einfaches, kostengünstiges und effizientes Prüfmittel zu ersetzen, das dem Anwender jederzeit zur Verfügung steht.

Diesen Vorgaben wird Speichel als unkompliziert zugängliches und jederzeit verfügbares Prüfmittel in idealer Weise gerecht. Spezifische, natürliche Inhaltsstoffe von humanem Speichel fungieren bei der vorliegenden Erfindung als notwendige Komponente oder Mischung von Komponenten zur erfolgreichen Durchführung einer Originalitätsprüfung bei einem entsprechend markierten Objekt, wobei die Erzeugung eines spezifischen Signals die Originalität des markierten geprüften Objekts bestätigt.

Die obengenannte Aufgabe wird somit erfindungsgemäß durch ein Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.

Eine bevorzugte grundsätzliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens beruht auf der Umsetzung eines Substrats (und gegebenenfalls Cosubstrats) mit einem geeigneten Enzym, wobei die Produkte der Umsetzung direkt oder nach Kombination mit einem Indikatorsystem ein spezifisches nachweisbares Signal ergeben, das die Originalität (Echtheit) des Objekts bestätigt.

Hierbei ist vorzugsweise das katalysierende Enzym im Speichel enthalten. Die anderen zur Signalerzeugung erforderlichen Komponenten, wie z. B. Substrat, gegebenenfalls Cosubstrat, Indikatorsystemkomponenten und andere für die Signalerzeugung erforderlichen Enzyme, die nicht im Speichel enthalten sind, liegen in dem Marker vor, der mit dem Objekt verbunden oder in ihm enthalten ist.

Als Speichelenzym wird vorzugsweise das Enzym α -Amylase im Speichel genutzt. Dieses Enzym spaltet bevorzugt Stärke oder Stärkederivate wie beispielsweise Hydroxyethylstärke. Das Stärkemolekül wird durch die α -Amylase mit statistischer Verteilung der Spaltstellen in oligomer verzweigte Saccharidbruchstücke und teilweise auch schon in den Einfachzucker Glucose gespalten. Diese Glucoseeinheiten dienen dann als Substrat für die nachfolgende enzymatische Umsetzung, die zur Signalerzeugung führt. Optional kann z. B. auch noch das Enzym 1,6-Glucosidase auf dem Objekt bereitgestellt werden, um eine weitere Spaltung von Oligomeren in Glucoseeinheiten zu katalysieren.

Auf dem markierten Objekt sind bevorzugt die Enzyme Glucoseoxidase, Peroxidase, ein Substrat wie z. B. Tetramethylbenzidin (TMB), ein Peroxid, z. B. Wasserstoffperoxid, immobilisiert. Bei der enzymatischen Spaltung der Stärke in Glucoseeinheiten, die mit Hilfe der α -Amylase aus Speichel und gegebenenfalls bereitgestellter 1,6-Glucosidase katalysiert wird, wird durch die enzymatische Umsetzung der Enzyme Glucoseoxidase und Peroxidase mit Hilfe von z. B. TMB und H_2O_2 ein z. B. blaues Signal erzeugt.

Die nicht im Speichel enthaltenen, für die Reaktion erforderlichen Komponenten werden in geeigneten Matrices auf das Objekt aufgebracht. Solche Matrices sind

hydrophile und hydrophobe Lacke, Farbmaterialien oder Polymere. Je nach Matrix können die individuellen Komponenten direkt in diese Matrices eingemischt werden. Alternativ können die nicht im Speichel enthaltenen, für die Reaktion erforderlichen Komponenten in geschützter Form, z. B. in Mikrokapseln oder Mikropartikel eingeschlossen, eingebracht werden. Mit Mikrokapseln werden im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Mikrogehäuse aus unterschiedlichen Materialien, z. B. Gelatine, Stärke, Cyclodextrin oder Chitosan verstanden, die mit dem jeweils gewünschten Inhaltsstoff bzw. Inhaltsstoffen befüllt werden. Als Mikropartikel dagegen werden poröse dreidimensionale Strukturen bezeichnet, die ebenfalls aus Gelatine, Stärke, Cyclodextrin oder Chitosan bestehen können, aber auch aus Polymeren oder Copolymeren. Die Mikropartikel enthalten ein oder mehrere Inhaltsstoffe entweder in die dreidimensionale poröse Struktur eingebettet oder adsorbtiv an deren Oberfläche gebunden.

In einer zweiten bevorzugten grundsätzlichen Ausführungsform umfaßt der Marker daher Mikrokapseln oder Mikropartikel, die durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen aufgeschlossen, d. h., geöffnet, gespalten oder auf andere Weise, z. B. durch physikalische Wechselwirkung, dahingehend beeinflußt werden, dass eingeschlossene oder chemisch gebundene oder adsorbierte Inhaltsstoffe oder Bestandteile der Mikrokapseln oder Mikropartikel freigesetzt werden.

Bei der Mikroverkapselung handelt es sich um einen Prozeß, bei dem die gewünschten Stoffe in Kapseln, vorzugsweise einer Größe von etwa 1-100 µm, eingeschlossen werden. Dabei werden diese Materialien vollständig und lückenlos umhüllt. Diese Umhüllung dient zunächst dem Schutz der umschlossenen Komponenten vor äußeren Einflüssen (z. B. Luftsauerstoff, Feuchtigkeit, andere chemische Reaktionspartner) und darüber hinaus der gezielten Freisetzung unter den jeweils geeigneten Bedingungen. Viele Stoffe würden in gelöster Form oder einfach frei in der Matrix vorliegend schnell an Aktivität verlieren und können auf diese Weise eingeschlossen bis zum gewünschten Zeitpunkt reaktionsfähig erhalten werden.

Die Herstellung von Mikrokapseln erfolgt mit verschiedenen Technologien, die kommerziell von verschiedenen Spezialisten angeboten werden und insbesondere in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie breite Anwendung finden.

Bei der Herstellung von Mikrokapseln kommen Verfahren wie Extrusion/Versprühen/Kühlen, Extrusion/Cutting, Coating/Extrusion/Vermahlen, Koazervation oder Emulsion/Extrusion und andere Verfahren zur Anwendung. Die Mikrokapseln oder Mikropartikel können sich in einem Medium oder einer Matrix befinden, welche(s) gegebenenfalls ebenfalls Komponenten zur Signalerzeugung enthalten kann.

Das Medium oder die Matrix, in welche(s) die Mikrokapseln oder Mikropartikel z. B. durch Einmischen eingebracht werden, besteht beispielsweise aus Materialien, die in der Drucktechnik üblicherweise eingesetzt werden. Dies sind handelsübliche Lacke wie UV-Lacke, Farben, wasserlösliche Lacke, z. H. Hydrokett HK P061 von Akzo Nobel, Lösemittellacke oder handelsübliche Kleber z. B. Hotmeltkleber. Diese Materialien werden auf die entsprechenden Unterlagen durch übliche Drucktechniken wie Siebdruck, Tiefdruck, Flexodruck oder Offsetdruck aufgebracht. Die Trocknung der Materialien erfolgt beispielsweise durch UV-Trocknung, die zur Polymerisation der Materialien führt.

In beiden Ausführungsformen wird die signalerzeugende Reaktion einfach dadurch gestartet, dass das markierte Objekt, beispielsweise ein Produkt, eine Produktverpackung, eine Zollmarke, ein Etikett oder ein Wertdruck, vom prüfenden Anwender mit Speichel oder einer Flüssigkeit, die mindestens einen Speichelbestandteil, vorzugsweise ein oder mehrere Speichelenzym(e), enthält, an der Stelle der Markierung benetzt wird. Das Signal entsteht vorzugsweise direkt auf dem markierten Objekt. Alternativ ist jedoch auch eine Übertragung von signalerzeugenden Komponenten auf eine separate Testvorrichtung, wie z. B. in DE 100 02 819 A1 offenbart, möglich.

Die Erfindung stellt somit ein Nachweissystem zur Prüfung der Originalität eines Objekts bereit, wobei mindestens ein Bestandteil, der für den Nachweis erforderlich ist, in Speichel enthalten ist und mindestens eine Komponente in einem Marker vorliegt, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist.

Einige nicht-beschränkende Beispiele für geeignete enzymatische Aktivitäten in humanem Speichel sind Amylasen, vorzugsweise α -Amylasen, Lysozym, Peroxidase und Lactoferrin. Diese können als Speichel oder in Form einer Flüssigkeit, die eines oder mehrere dieser Enzyme enthält, eingesetzt werden.

Die in der zweiten grundsätzlichen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens einzusetzenden Kapseln bzw. Partikel besitzen eine Größe und/oder Wandstärke, die den jeweiligen Anforderungen für optimale Signalerzeugung und bequeme Markierung des Objekts (z. B. durch Druckverfahren) angepasst ist. Die Größe der Kapseln bzw. Partikel beträgt vorzugsweise 1-100 μm . Zur Herstellung und Befüllung der Kapseln können gängige Verfahren eingesetzt werden (siehe z. B. Carbohydrate Polymers 1994, 24 (4) 295-300, Advances in Polymer Science 136, Springer Verlag, 1998; Abe, Albertson et al.). Geeignete Kapseln, die einem gewünschten Anforderungsprofil entsprechen, können auch von darauf spezialisierten Firmen bezogen werden.

Die Technologie zur Verkapselung bzw. zum Einschluß von Inhaltsstoffen hängt größtenteils auch von der Natur der Inhaltsstoffe ab. Um die Verkapselungstechnologie mit den beabsichtigten Inhaltsstoffen zur Signalerzeugung möglichst unkompliziert zu gestalten, kann sie an gängige Technologien zur Verkapselung anderer Inhaltsstoffe angelehnt werden. So können die hier interessierenden Inhaltsstoffe auch mit Hilfsstoffen kombiniert verkapselt bzw. in Mikropartikel eingeschlossen bzw. gebunden werden.

Bevorzugte Grundmaterialien für solche Mikrokapseln oder Mikropartikel sind Substanzen, welche als Substrate für Speichelenzyme, wie z. B. die oben genannten, dienen können. Die Enzym-Substrat-Umsetzung führt dann zu einer Öffnung der Mikrokapseln und/oder zur Spaltung von Strukturen der Mikropartikel

und zur Freisetzung der eingeschlossenen bzw. anderweitig gebundenen oder immobilisierten Komponenten für die Signalerzeugung. Diese Grundmaterialien können nach Bedarf so modifiziert und/oder mit Hilfsstoffen ergänzt bzw. kombiniert werden, dass gewünschte chemische oder physikalische Eigenschaften bezüglich der hier vorgesehenen Anwendung optimiert werden. Zu diesen Eigenschaften zählen beispielsweise eine ausreichende enzymatische Spaltbarkeit durch die Speichelenzyme, eine ausreichende chemische Langzeitstabilität auf dem markierten Objekt, eine ausreichende Eignung bezüglich der technischen Verarbeitbarkeit und geeignete Löslichkeitseigenschaften in der technischen Verarbeitung und im Rahmen des Prüfprozesses mit Speichel. Um eine Löslichkeit der Kapseln bzw. Partikel durch Wasser allein, also ohne die Einwirkung von speichelspezifischen Enzymen, zu minimieren bzw. auszuschließen, kann beispielsweise eine Vernetzung oder anderweitige Modifizierung der Kapsel- oder Partikeloberfläche vorgenommen werden. Eine solche Vernetzung kann beispielsweise mit Polypeptiden erfolgen. Entsprechende Modifikationen des Kapsel- bzw. Partikelmaterials führen auch dazu, dass ein Aufschluß der Kapseln bzw. Partikel rasch und unter realistischen Bedingungen, also vorzugsweise bei Raumtemperatur, erfolgt und somit eine ausreichend rasche und intensive Signalerzeugung gewährleistet ist.

Bevorzugte Grundmaterialien sind das Polymer Chitosan und Derivate davon, die durch das Speichelenzym Lysozym spaltbar sind, oder Poly-L-lysin.

Ebenfalls bevorzugt sind Materialien auf Stärkebasis, die durch Amylasen, vorzugsweise α -Amylasen, spaltbar sind. Solche Materialien auf Stärkebasis umfassen Stärke und verschiedene Arten von modifizierten Stärkederivaten, beispielsweise eine Hydroxyalkylstärke, z. B. Hydroxyethylstärke, oder Cyclodextrin, deren chemische und physikalischen Eigenschaften an die vorgesehene Verwendung angepasst werden können.

Die Verwendung unterschiedlicher Kapsel- bzw. Partikeltypen, beispielsweise auf der Grundlage unterschiedlicher chemischer Modifikationen und/oder Wandstärken, ermöglicht einen zeitlich versetzten Aufschluß. Dadurch ist es möglich,

verschiedene Inhaltsstoffe aus verschiedenen Kapsel- und/oder Partikeltypen sukzessive freizusetzen und damit Signale zeitlich hintereinander zu erzeugen und Signalkaskaden zu bilden. Dadurch wird das Imitieren der Signalerzeugung erheblich erschwert.

Das erfindungsgemäß erzeugte Signal kann auf verschiedene Arten nachweisbar sein. Vorzugsweise wird es ein Signal sein, das direkt mit einem der menschlichen Sinne wahrnehmbar ist. Besonders bevorzugt wird es sich um ein optisches, insbesondere farbiges, Signal handeln. Das optische Signal kann auch ein Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder Phosphoreszenzsignal sein, welches erst unter geeigneten Bedingungen, z. B. Bestrahlung mit UV-Licht oder im Dunkeln, sichtbar wird. Alternativ könnte das Signal auch mit dem Geruchs- oder Geschmackssinn wahrnehmbar sein.

In einer alternativen Ausführungsform wird ein physikalisches, einschließlich optisches, Signal erzeugt, das durch ein geeignetes Meßinstrument ausgewertet werden kann. Solche Instrumente können z. B. Fluoreszenzmesser, Reflektometer, Leitfähigkeitsmesser etc. sein.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Signal erzeugt, das durch eine andere nicht-instrumentelle Prüfvorrichtung, beispielsweise in Anlehnung an die Prüfvorrichtung in DE 100 02 819 A1, ausgewertet werden kann.

Das Signal kann durch die Freisetzung einer einzelnen Komponente, durch die Freisetzung unterschiedlicher Komponenten oder durch das Zusammenwirken bzw. eine Reaktion unterschiedlicher Komponenten erzeugt werden.

In einer Ausführungsform können alle für die Signalerzeugung erforderlichen Komponenten mit Ausnahme der Speichelkomponenten in den Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln eingeschlossen und zur Signalerzeugung gezielt freigesetzt werden. In einer anderen Ausführungsform, die in jedem Fall mehr als nur eine Komponente zur Signalerzeugung erfordert, wird nur ein Teil der Komponenten in Mikrokapseln bzw. Mikropartikel eingeschlossen, während der andere Teil der Komponenten frei

im umgebenden Medium, beispielsweise einer Druckfarbe oder Kunststoffmatrix (siehe oben), vorliegen kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft auch Verfahren und Zusammensetzungen zur Signalerzeugung, bei denen ein spezifisches Signal durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln, insbesondere organischen Lösungsmitteln, auf das markierte Objekt erzeugt wird.

In einer Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung werden Mikrokapseln oder Mikropartikel eingesetzt, welche vorzugsweise durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften geöffnet werden können. Geeignete Grundmaterialien für derartige Kapseln sind beispielsweise Wachse, Alginate, Casein, Gelatine oder Liposomen. Diese Grundmaterialien können nach Bedarf so modifiziert und/oder mit Hilfsstoffen ergänzt bzw. kombiniert werden, dass gewünschte chemische oder physikalische Eigenschaften bezüglich der hier vorgesehenen Anwendung optimiert werden. Zu diesen Eigenschaften zählen beispielsweise eine ausreichende chemische und mechanische Langzeitstabilität auf dem markierten Objekt und technische Verarbeitbarkeit. Die Kapseln besitzen eine Größe und Wandstärke, die den jeweiligen Anforderungen für optimale Signalerzeugung und bequeme Markierung des Objekts und dem speziellen Verwendungszweck angepaßt sind. Die Kapselgröße wird im allgemeinen in einem Bereich von etwa 1-100 µm liegen. Geeignete Kapseln mit den speziell gewünschten Eigenschaften können von spezialisierten Firmen bezogen werden. In den Kapseln sind signalerzeugende Komponenten eingeschlossen, die nach Öffnung der Kapseln durch Scherkräfte freigesetzt werden und ein spezifisches Signal entsprechend den im folgenden beschriebenen Mechanismen erzeugen. Diese Art der Signalerzeugung durch mechanische Einwirkung auf das markierte Objekt kann zu verschiedenen Zwecken eingesetzt werden.

In einer Ausführungsform wird die Originalität eines so markierten Objekts auf einfache und unkomplizierte Weise überprüft. Die mechanischen Scherkräfte z. B. durch Reiben eines Gegenstand, beispielsweise des Fingernagels des Prüfers, auf dem markierten Objekt, beispielsweise einem Etikett, erzeugt, dienen hier als

einfaches, kostenloses und jederzeit verfügbares Prüfmittel. Ein solches Nachweisverfahren kann zusätzlich oder alternativ zu dem oben beschriebenen Nachweisverfahren unter Verwendung von menschlichem Speichel eingesetzt werden. Die diesbezüglich gemachten allgemeinen Ausführungen zur Herstellung und Verwendung von Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln gelten, soweit nicht speziell auf die Öffnung der Kapseln durch Speichelenzyme bezogen, grundsätzlich auch für das hier angesprochene Verfahren mit mechanisch zu öffnenden Kapseln. Dies trifft insbesondere auch für die im folgenden beschriebenen verschiedenen Mechanismen und Systeme der Signalerzeugung zu.

In einer zweiten Ausführungsform werden die hier beschriebenen, mechanisch zu öffnenden Kapseln zum Nachweis der Manipulation eines markierten Originalprodukts eingesetzt.

Beispielsweise versuchen Fälscher, Etiketten von gebrauchten Originalprodukten zu entfernen und auf Nachahmungen aufzubringen. Um dies zu verhindern, können beispielsweise derartige Kapseln in die Klebstoffmatrix auf der Rückseite des Etiketts eingebracht werden. Beim Versuch, das Etikett durch Abreißen vom Originalprodukt zu entfernen, öffnen sich die Kapseln durch die auftretenden Scherkräfte und ein Signal, z. B. eine Färbung, wird erzeugt.

Bei einer alternativen Vorgehensweise versuchen Fälscher, die Etiketten mit Hilfe von Benzin oder anderen, vorzugsweise organischen Lösungsmitteln zu entfernen.

Um eine solche Manipulation nachzuweisen, sollte das Etikett dabei so verändert werden, dass es als manipuliert erkannt werden kann. Eine Möglichkeit hierfür besteht in der Einführung von signalerzeugenden Komponenten, beispielsweise Pigmentpartikeln, in z. B. die Klebstoffmatrix des Etiketts, die unter dem Einfluß von Lösungsmitteln durch physikalische oder chemische Wechselwirkung ein Signal ergeben. So können z. B. in einer Ausführungsform lipophile Farbstoffe, vorzugsweise als Dispersion, in die Matrix eingebracht werden. Eine Manipulation zum Zweck des Ablösens des Etiketts führt dazu, dass sich der Farbstoff in der Matrix löst und so ein Signal verursacht, welches das Etikett nachweisbar verändert.

Beispielsweise kann der lipophile Farbstoff β -Carotin in Form kleinster Tröpfchen als Dispersion in die Klebstoffmatrix eingebracht werden. Unter dem Einfluß lipophiler Lösungsmittel, wie beispielsweise Benzin, verteilen sich die in der Dispersion kaum sichtbaren Tröpfchen gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche und erzeugen so eine Färbung, die das Etikett als manipuliert kennzeichnet. Diese Markierungs- und Signalerzeugungsverfahren zum Schutz vor Fälschungen und Manipulationen werden vorzugsweise parallel zu den oben beschriebenen Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts, vorzugsweise unter Verwendung von humanem Speichel als Prüfmittel, eingesetzt.

Im Folgenden werden beispielhaft verschiedene Systeme und Komponenten zur Signalerzeugung beschrieben. In der zweiten grundsätzlichen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens zur Prüfung der Originalität eines Objekts unter Verwendung von humanem Speichel ist dabei jeweils mindestens eine der zur Signalerzeugung erforderlichen Komponenten durch die Einwirkung von humanem Speichel bzw. von darin enthaltenen Komponenten, z. B. der obengenannten Speichelenzyme, aus Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln freizusetzen. Die einsetzbaren Systeme und Komponenten, z. B. Katalysatoren, insbesondere Enzyme, Reaktionspartner, Indikatoren oder auch das durch die Freisetzung von Komponenten im Medium veränderte Milieu, sind sehr variabel und können somit auch eine sehr große Bandbreite von Signalen erzeugen. Dem entsprechend sind die im Folgenden erläuterten speziellen Ausführungsformen keineswegs als Beschränkung der Erfindung zu verstehen. Für einen Fachmann werden geeignete Modifikationen oder Alternativen der beschriebenen Ausführungsformen unschwer ersichtlich sein.

Direkte Signalerzeugung durch Farbstoffe

Farbgebende Komponenten, wie z. B. Farbpigmente u. B. Carotinoide, Azorubin oder Gelborange, oder andere Pigmente wie Cobaltblau oder Rinnmansgrün, werden in Mikrokapseln oder Mikropartikel eingeschlossen. In den Kapseln bzw. Partikeln liegen die Farbstoffe in kompakter Form vor, während sie sich nach der Freisetzung

relativ gleichmäßig im Medium verteilen. Dieses veränderte Verteilungsmuster liefert ein optisches Signal, das vorzugsweise als Färbung auf dem Objekt wahrnehmbar ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Färbung von Pigmenten durch die Mikrokapseln oder -partikel ganz oder teilweise abgeschirmt oder verändert. Die Freisetzung der Pigmente reduziert diese Abschirmung und führt somit zu einem optischen Signal.

Direkte Signalerzeugung durch Indikatoren

Substanzen, die als pH-Indikatoren in bekannten Reaktionen fungieren, werden mikroverkapselt. Bei Freisetzung des Indikators tritt eine pH-Änderung ein, die entweder durch den Speichel hervorgerufen wird oder durch eingebrachte Substanzen, z. B. Salze im umgebenden Medium, z. B. ein flüssiges Medium wie Druckerfarbe oder ein Matrixmaterial, vorgegeben ist, und führt so zu einem Farbumschlag des Indikators. Dabei wird der Indikator z. B. in neutralem Milieu verkapselt und findet im Medium ein saures oder basisches Milieu vor, wodurch ein Farbumschlag hervorgerufen wird. Beispielsweise werden Phenolphthalein oder Lackmus bei definiertem pH-Wert in neutralem Milieu verkapselt und finden nach der Freisetzung einen basischen pH-Wert im Medium vor, wodurch ein Farbumschlag nach rot erfolgt.

Signalerzeugung durch anorganische Reaktionen

Es werden z. B. Salze oder Salzlösungen, also Ionenlösungen, in verschiedenen Kapselkollektiven separat verkapselt. Der Begriff Kapselkollektiv, wie hier verwendet, umfaßt diejenigen gleichartigen Kapseln, die identisches Material verkapseln. Nach der Freisetzung kommen Ionen in Kontakt, die präzipitierende, vorzugsweise farbige, Niederschläge, farbige Kolloide oder Suspensionen oder farbige Lösungen, beispielsweise Komplexverbindungen, bilden. Diese farbigen Produkte werden als optisches Signal auf dem markierten Objekt sichtbar. Alternativ kann auch eine der Komponenten unverkapselt im umgebenden Medium vorliegen.

In einem typischen Beispiel wird eine Lösung von rotem Blutlaugensalz ($K_3[Fe(CN)_6]$) und eine Lösung von Eisen (II)-Salz oder eine Lösung von gelbem Blutlaugensalz ($K_4[Fe(CN)_6]$) und eine Lösung von Eisen (III)-Salz separat verkapselt. Nach Öffnung der Kapseln wird kolloidal gelöstes Berlinerblau gebildet.

Es folgen einige weitere, nicht beschränkende Beispiele für Ionenreaktionen mit farbigen Reaktionsprodukten, vorzugsweise farbigen Präzipitaten:

$S_2O_3^{2-} + Ag^+ \rightarrow Ag_2SO_3$; Präzipitat: erst weiß, dann gelb, schließlich schwarz

$Li^+ + FeIO_4 \rightarrow Li_2FeIO_6$; Präzipitat: weiß/gelb

$Ni^{++/+++} + Na_2CO_3 \rightarrow Ni\text{-Carbonat}$; Präzipitat

$Co^{++/+++} + Na_2CO_3 \rightarrow Co\text{-Carbonat}$; bläulich/rötliches Präzipitat

$Fe^{+++} + SCN^- \rightarrow Fe(SCN)_3$; rotes Präzipitat

Bei den beispielhaft genannten Umsetzungen werden jeweils Komponenten verkapselt bzw. in Mikropartikeln eingeschlossen, die beim Kontakt mit anderen Komponenten zu entsprechenden Präzipitaten bzw. Reaktionsprodukten führen. Dabei ist mindestens eine Ionenkomponente verkapselt bzw. in Mikropartikeln eingeschlossen, während die andere Ionenkomponente entweder ebenfalls eingeschlossen oder frei in dem umgebenden Medium vorliegen kann.

Signalerzeugung durch organische Reaktionen

Grundsätzlich sind alle Reaktionen geeignet, bei denen mindestens zwei Reaktionspartner zur Bildung farbiger Reaktionsprodukte beitragen und damit zur Signalerzeugung führen. Der Begriff „organische Reaktionen“, wie hier verwendet, soll auch Reaktionen einschließen, bei denen nur ein Reaktionspartner ein organisches Molekül ist. Es können wiederum alle Reaktionspartner oder mindestens einer davon in Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln eingeschlossen sein, so dass alle zur signalerzeugenden Reaktion erforderlichen Komponenten erst nach Freisetzung aus den Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln in Kontakt kommen. Vorzugsweise soll die Reaktion spontan durch den Kontakt der Reaktionspartner im Medium, also insbesondere auch ohne erhebliche externe Energiezufuhr, ablaufen.

Einige spezielle Beispiele für geeignete organische Reaktionen sind die Bildung von Triphenylmethanfarbstoffen oder die Bildung von Methylenblau, das aus einer Leukoverbindung durch eine Redoxreaktion entsteht, oder die Bildung von Azofarbstoffen. Bevorzugte Beispiele sind die Bildung von Indigoblau aus Indigo mit Dithionit oder die Diazotierung von Anilin zu Anilingelb.

Ein Beispiel für die Bildung eines farbigen Komplexes zwischen einem Metallion und organischen Liganden ist der Ni-Diacetyldioxim-Komplex, der einen intensiv roten Niederschlag ergibt. Ein weiteres Beispiel ist die Reaktion vieler Phenole mit Fe(III)-chlorid unter Bildung farbiger Komplexe.

Eine bevorzugte Gruppe von organischen Reaktionen sind diejenigen zwischen Elektronenakzeptor-Verbindungen und Elektronendonator-Verbindungen, die zur Bildung von farbigen Charge-Transfer-Komplexen führen. Als Elektronendonator bevorzugt sind aromatische und hetero-aromatische Verbindungen mit elektronenliefernden Substituenten, z. B. aromatische Amine (Anilin), Alkylbenzole (Friedel-Crafts-Acylierung). Als Elektronenakzeptor kommen z. B. substituierte Aromaten und Hetero-Aromaten mit elektronenziehenden Substituenten, z. B. aromatische Ketone, sowie andere organische oder anorganische elektrophile Verbindungen, z. B. bekannte Lewissäuren, in Frage (Trimethylboran, Magnesiumionen,

Trimethylkationen). Die Bindungspartner für Charge-Transfer-Komplexe können auch anorganische oder organische Ionen oder Radikale sein.

Beispiele für derartige Charge-Transfer-Komplexe sind die farbigen Addukte von p-Benzochinon und Hydrochinon mit z. B. Dimethylbenzol oder Trimethylbenzol oder der Komplex, welcher das Ergebnis der Umsetzung von 3-(Dimethylamino)benzoesäure mit 4-(Dimethylamino)antipyrin in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Peroxidase ist (US 4,321,397). Ein weiteres Beispiel ist die Farbreaktion des nahezu farblosen Aquokomplexes von Fe^{3+} bei Zugabe der entsprechenden Ionen in geeigneten Konzentrationen zum gelben Chlorokomplex oder zu den roten Rhodanidkomplexen. Bei Verwendung im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren liegt mindestens ein Reaktionspartner für das Addukt verkapselt oder in Mikropartikeln vor.

Signalerzeugung durch katalysierte Reaktionen

Bei dieser Ausführungsform ist die katalytische Komponente zuerst von den Reaktionspartnern der chromogenen Reaktion getrennt. Dabei ist es möglich, entweder nur die katalytische Komponente oder die katalytische Komponente und einen oder alle Reaktionspartner zu verkapseln bzw. in Mikropartikel einzuschließen. Alternativ liegt die katalytische Komponente in der Matrix bzw. dem Medium vor, während ein oder mehrere Reaktionspartner verkapselt ist/sind. Die Verkapselung oder der Einschluß katalytischer Komponenten erlaubt es, dass der oder die Reaktionspartner bereits in dem Medium oder der Matrix vorliegen können und die Freisetzung der katalytischen Komponente die Reaktion in Gang setzt. Da Katalysatoren häufig in sehr geringen Mengen wirksam sind, bietet dies den Vorteil, dass bereits die Freisetzung geringer Mengen an katalytischer Substanz die chromogene Reaktion auslösen kann. Dies ist im Sinne einer raschen Reaktion und damit einer raschen Signalerzeugung sehr günstig. Ein Beispiel für eine katalytische Reaktion ist die säurekatalysierte Dimerisierung bestimmter Ausgangsverbindungen durch Friedel-Crafts-Acylierung. Dies führt zur Ausbildung von Zwischenstufen, die katalytisch durch Luftsauerstoff zur Endstufe des Farbstoffs oxidiert werden.

Signalerzeugung durch Enzym-Substrat-Systeme

Die Signalerzeugung erfolgt vorzugsweise mit chromogenen Substraten, wobei sich beispielsweise das Enzym in einem Kapselkollektiv, das Substrat und gegebenenfalls weitere chromogene Komponenten bzw. Indikatorkomponenten in mindestens einem weiteren Kapselkollektiv oder im umgebenden Medium befinden. Bei Enzymen, die aus einem Apoenzym und einem Coenzym aufgebaut sind, kann sich das Coenzym zusammen mit dem Apoenzym in einem Kapselkollektiv oder getrennt davon befinden. Im letzteren Falle kann es allein in einem Kapselkollektiv oder in dem Medium, oder zusammen mit dem Substrat in einem Kapselkollektiv oder dem Medium vorliegen. Die Spaltung der Kapseln führt zum Kontakt der zuvor separaten Komponenten und ermöglicht so die Reaktionen, die eine Signalerzeugung zur Folge haben.

Erfindungsgemäß verwendbare Substrate sind alle chemische Verbindungen, deren enzymatische Umsetzung direkt zu einem nachweisbaren signalerzeugenden Produkt, z. B. einem farbigen Produkt, führt oder deren Umsetzung zu einem primären Produkt führt, das durch Kombination mit einem Indikatorsystem zu einem signalerzeugenden sekundären Produkt führt.

Solche Substrate sind für viele gebräuchliche Enzyme bekannt oder können nach bekannten Verfahren hergestellt werden. So können beispielsweise geeignete Substrate von kohlenhydratspezifischen Enzymen, Proteasen, Nukleasen, Lipasen, Oxidasen, Peroxidasen, Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen und Kinasen erfindungsgemäß eingesetzt werden. Speziellere, nicht beschränkende Beispiele sind Substrate von Amylasen, z. B. α -Amylasen, Oxidasen, z. B. Cholesterinoxidase, Uricase, Peroxidasen, Phosphatasen, z. B. alkalische Phosphatase, Galaktosidasen, Glukosidasen, DNAsen, RNAsen, Lysozym, Lactoferrin etc. Beispiele für chromogene Substrate sind p-Nitrophenylphosphat, das durch alkalische Phosphatase in ein gelbes Reaktionsprodukt umgesetzt wird, oder Tetramethylbenzidin (TMB), das in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in ein blaues Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Eine grundsätzliche Vorgehensweise zur Herstellung chromogener Substrate besteht beispielsweise darin, an ein größeres

Molekül eine latent chromogene Gruppe zu koppeln, welche durch die enzymatische Reaktion abgespalten wird und dann ein optisches Signal ergibt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden geeignete Substrate für Speichelenzyme, wie z. B. Amylasen, Peroxidase, Lysozym oder Lactoferrin, gewählt. Dies bietet den Vorteil, dass die enzymatische Aktivität von humanem Speichel bzw. von darin enthaltenen Komponenten sowohl die Mikrokapseln/partikel aufschließen als auch die signalerzeugende Reaktion starten kann.

Falls kein primäres Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung ein direkt nachweisbares Signal ergibt, kann das oder ein Reaktionsprodukt mit Komponenten eines geeigneten Indikatorsystems unter Bildung eines nachweisbaren, z. B. farbigen oder fluoreszierenden, sekundären Produkts umgesetzt werden. Im Stand der Technik sind eine Reihe geeigneter Indikatorsysteme für verschiedene bekannte Enzym-Substrat-Systeme bekannt. Entsteht beispielsweise bei der enzymatischen Reaktion ein Oxidationsmittel, wie z. B. Wasserstoffperoxid, so kann dieses einen geeigneten Reaktionspartner, z. B. gelbes Blutlaugensalz, oxidieren, wodurch ein stark gefärbtes Produkt entsteht. Auf analoge Weise kann auch ein entstandenes Reduktionsmittel weiter umgesetzt werden. Alternativ kann das oder ein primäres Reaktionsprodukt als Substrat für ein zweites Enzym dienen, welches dann ein gefärbtes oder anderweitig nachweisbares Reaktionsprodukt ergibt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das oder ein Reaktionsprodukt mit einem spezifischen Bindungspartner umgesetzt wird, der nach der Kopplung ein Signal erzeugen kann.

Ein spezielles Beispiel für ein erfindungsgemäßes Enzym-Substrat-System ist die Verkapselung des Enzyms Peroxidase in einem Kapselkollektiv und von geeigneten Substratkomponenten, vorzugsweise TMB-Fertigsubstrat (z. B. TMB ONE von Biotrend, Köln, Deutschland) in einem weiteren Kollektiv. Das TMB-Fertigsubstrat wird nach einem bekannten Reaktionsmechanismus in ein blaues Endprodukt umgesetzt.

Signalerzeugung durch Kombination von spezifischen Bindungspartnern

Der Einschluß von mindestens einem von zwei oder mehr spezifischen Bindungspartnern in Mikrokapseln oder Mikropartikel führt nach der Freisetzung zur Bindung und anschließend direkt oder indirekt mit Hilfe entsprechender Marker zur Erzeugung eines nachweisbaren Signals.

Ein Beispiel dafür ist die separate Verkapselung von zueinander komplementären einzelsträngigen Nukleinsäure-Molekülen, z. B. DNS oder RNS oder Hybride davon, die nach der Freisetzung miteinander zu einem Doppelstrang hybridisieren, wobei als Folge der Hybridisierung ein spezifisches Signal erzeugt wird. Dieses Signal kann beispielsweise durch Interkalation eines Farbstoffes oder Fluoreszenzfarbstoffes, z. B. Ethidiumbromid, in den Doppelstrang erzeugt werden. Alternativ können die Einzelstränge jeweils mit Markermolekülen versehen sein, die erst nach der Hybridisierung miteinander in Kontakt kommen und das Signal erzeugen können. Solche Marker sind im Stand der Technik bekannt (z. B. erhältlich von der November AG, Erlangen). Zum Schutz der Nukleinsäure vor UV-Strahlung können ferner Hilfsstoffe, z. B. Zinkoxid, eingesetzt werden.

Ein weiteres Beispiel ist der separate Einschluß, vorzugsweise die Verkapselung, von zueinander komplementären Proteinen oder anderen Molekülen, z. B. Antigen und Antikörper oder Rezeptor und Ligand, oder der Einschluß von mindestens einem der jeweils komplementären Bindungspartner. Auch hier muß mindestens ein Bindungspartner mit einem Marker versehen sein, der erst nach der Vereinigung der Bindungspartner ein Signal ergibt.

Signalerzeugung durch Kombination mehrerer Mechanismen

Die genannten Methoden zur Signalerzeugung können auch beliebig miteinander kombiniert werden, wobei Komponenten einzeln oder gemeinsam in verschiedenen Kapselkollektiven oder Partikelkollektiven eingeschlossen und freigesetzt werden können. Damit sind auch mehrstufige Reaktionskaskaden möglich, so dass mehrere unterschiedliche Signale an derselben Stelle des markierten Objekts gleichzeitig oder zeitlich versetzt erzeugt werden können und das entstehende komplexe

Signalmuster ausgewertet werden kann. Zusätzlich oder alternativ ist es auch möglich, mehrere unterschiedliche Signale an verschiedenen Stellen des Objekts zu erzeugen. Eine komplexere Signalerzeugung erhöht die Sicherheit vor möglichen Fälschungen.

Die folgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Nachweisverfahren näher erläutern.

BEISPIEL

Mit Silbernitratlösung (10 mg/ml) gefüllte Stärkekapseln werden mit einem Volumenanteil von 5 Gewichtsprozent in den Lack Hydrokett HKP061 von Akzo Nobel eingemischt. Zusätzlich wird eine Natriumchloridlösung (7%-ig) im Verhältnis 1/10 bis 1/4 in den Lack unverkapselt eingemischt. In Folge wird der Lack mit üblichen technologischen Verfahren auf die Papieroberfläche in einer Schichtdicke von mehreren μm aufgebracht und luftgetrocknet.

Bei Benetzung mit Speichel diffundiert dieser in die Lackmatrix und die Kapseln werden geöffnet. Die freigesetzte Silbernitratlösung bildet mit den Chlorid-Ionen eine schwarze Färbung, die durch einen Niederschlag ausgelöst wird.

PATENTANSPRÜCHE

1. Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.
2. Nachweisverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine in humanem Speichel enthaltene enzymatische Aktivität auf den Marker einwirkt und mindestens eine durch diese enzymatische Aktivität katalysierte Reaktion direkt oder indirekt zur Erzeugung eines spezifischen Signals führt.
3. Nachweisverfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der enzymatischen Aktivität um die Aktivität von Lysozym, Lactoferrin, einer Amylase oder Peroxidase oder um eine Kombination davon handelt.
4. Nachweisverfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker mindestens ein Substrat für die in humanem Speichel enthaltene enzymatische Aktivität enthält und mindestens eine durch diese Aktivität katalysierte Reaktion mindestens ein Reaktionsprodukt ergibt, welches als solches oder in Kombination mit einem geeigneten Indikatorsystem ein spezifisches Signal erzeugt.
5. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker Mikrokapseln und/oder Mikropartikel umfaßt, welche durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen aufgeschlossen werden, so dass mindestens ein eingeschlossener Inhaltsstoff und/oder eine gebundene Komponente der Mikrokapseln und/oder Mikropartikel freigesetzt wird und direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.

6. Nachweisverfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroapseln und/oder Mikropartikel Materialien auf der Basis von Stärke oder Chitosan umfassen, welche durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Komponenten aufgeschlossen werden.
7. Nachweisverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien auf Stärkebasis Stärke, modifizierte Stärke oder Stärkederivate umfassen oder daraus bestehen.
8. Nachweisverfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien auf Stärkebasis eine Hydroxyalkylstärke, z. B. Hydroxyethylstärke, oder Cyclodextrin umfassen oder daraus bestehen.
9. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein freigesetzter Inhaltsstoff oder eine Komponente der Mikroapseln und/oder Mikropartikeln eine chemische oder physikalisch-chemische Reaktion eingeht und zur Bildung mindestens eines Reaktionsprodukts führt, das direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.
10. Nachweisverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Reaktion eine Enzym-katalysierte Reaktion ist.
11. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-10, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein freigesetzter Inhaltsstoff oder eine Komponente der Mikroapseln und/oder Mikropartikeln ein Katalysator ist und nach der Freisetzung eine Reaktion katalysiert, die zur Bildung mindestens eines Reaktionsprodukts führt, das direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.
12. Nachweisverfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Katalysator ein Enzym ist.

13. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal durch die Kombination des mindestens einen Reaktionsprodukts mit einem geeigneten Indikatorsystem erzeugt wird.
14. Nachweisverfahren nach einem Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung des mindestens einen Inhaltsstoffs oder eine Komponente der Mikrokapseln und/oder Mikropartikel direkt ein spezifisches Signal erzeugt.
15. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-14, dadurch gekennzeichnet, dass eine Mikrokapsel oder ein Mikropartikel mehrere Inhaltsstoffe oder Komponenten einschließt.
16. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-15, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker zwei oder mehr Mikrokapsel-Kollektive und/oder Mikropartikel-Kollektive umfaßt, die unterschiedliche Inhaltsstoffe oder Bestandteile enthalten und/oder unter unterschiedlichen Bedingungen aufgeschlossen werden.
17. Nachweisverfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass einige oder alle für die Signalerzeugung erforderlichen Komponenten mit Ausnahme der Speichelkomponenten auf zwei oder mehr Mikrokapsel-Kollektive und/oder Mikropartikel-Kollektive des Markers verteilt sind.
18. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-9, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer von zwei spezifischen Bindungspartnern oder beide in Mikrokapseln bzw. Mikropartikeln eingeschlossen ist/sind und diese nach der Freisetzung des mindestens einen Bindungspartners aneinander binden, wobei als Folge der Bindung ein spezifisches Signal erzeugt wird.
19. Nachweisverfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bindungspartnern um komplementäre einzelsträngige Nukleinsäure-Moleküle handelt, die nach der Freisetzung miteinander zu einem Doppel-

strang hybridisieren, wobei als Folge der Hybridisierung ein spezifisches Signal erzeugt wird.

20. Nachweisverfahren nach Anspruch 19, wobei das Signal durch die Interkalation eines Farbstoffs oder Fluoreszenzfarbstoffs in den Nukleinsäure-Doppelstrang erzeugt wird.
21. Nachweisverfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass zum Schutz der Nukleinsäure vor UV-Strahlung Hilfsstoffe, z. B. Zinkoxid, eingesetzt werden.
22. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 5-21, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Mikrokapseln und/oder Mikropartikel in einem Medium oder einer Matrix befinden.
23. Nachweisverfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium oder die Matrix mindestens eine weitere Komponente enthält, die zur Erzeugung des Signal notwendig oder vorteilhaft ist.
24. Nachweisverfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine weitere Komponente ein Katalysator, z. B. ein Enzym, oder ein Reaktionspartner für eine Reaktion ist, die zur Bildung mindestens eines Reaktionsprodukts führt, das direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.
25. Nachweisverfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal durch die Kombination des mindestens einen Reaktionsprodukts mit einem geeigneten Indikatorsystem erzeugt wird.
26. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-25, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal ein optisches Signal ist.

27. Nachweisverfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal durch anorganische und/oder organische farbige Verbindungen in festem oder gelöstem Zustand erzeugt wird.
28. Nachweisverfahren nach Anspruch 26 ~~oder 27~~, dadurch gekennzeichnet, dass freigesetzte Ionen farbige Lösungen, Kolloide oder schwerlösliche Präzipitate bilden und dadurch ein spezifisches Signal erzeugen.
29. Nachweisverfahren nach Anspruch 26 ~~oder 27~~, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal durch die Bildung von Charge-Transfer-Komplexen erzeugt wird.
30. Nachweisverfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal durch den Farbumschlag eines Indikators, vorzugsweise eines pH-Indikators, erzeugt wird.
31. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1 ~~25~~, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal mit dem Geruchssinn oder Geschmackssinn wahrgenommen wird.
32. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1 ~~30~~, dadurch gekennzeichnet, dass ein Signal erzeugt wird, welches durch geeignete Instrumente ausgewertet werden kann.
33. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1 ~~32~~, dadurch gekennzeichnet, dass eine einfache nicht-instrumentelle Hilfsvorrichtung zur Erzeugung und/oder Auswertung des Signals benutzt wird.
34. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1 ~~33~~, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere unterschiedliche Signale an verschiedenen Stellen des Objekts erzeugt werden.

35. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-34, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere unterschiedliche Signale gleichzeitig oder zeitlich versetzt erzeugt werden und das entstehende komplexe Signalmuster ausgewertet wird.
36. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-35, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal oder die Signale direkt auf dem Objekt erzeugt wird bzw. werden.
37. Zusammensetzung, umfassend ein Kollektiv oder mehrere Kollektive von Mikrokapseln und/oder Mikropartikeln, welche durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen aufschließbar sind, in einem flüssigen Medium oder in einer Matrix, wobei die Zusammensetzung alle für die Erzeugung eines Signals erforderlichen Komponenten mit Ausnahme der Speichelbestandteile in den Mikrokapseln/partikeln und/oder in dem Medium oder der Matrix enthält, wobei jedoch mindestens eine für die Signalerzeugung erforderliche Komponente in dem/n Mikrokapsel- oder Mikropartikel-Kollektiv/en so eingeschlossen ist, dass erst nach Freisetzung dieser Komponente durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen ein Signal entstehen kann.
38. Zusammensetzung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrokapseln und/oder Mikropartikel Materialien auf der Basis von Poly-L-lysin, Stärke oder Chitosan oder Derivaten davon umfassen.
39. Zusammensetzung nach Anspruch 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass alle für die Signalerzeugung erforderlichen Komponenten mit Ausnahme der Speichelbestandteile in einem oder mehreren Mikrokapsel- und/oder Mikropartikel-Kollektiv(en) eingeschlossen sind.
40. Zusammensetzung nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine einzige Komponente in einem einzigen Mikrokapsel- oder Mikropartikel-Kollektiv handelt.

41. Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.
42. Nachweisverfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker Mikrokapseln und/oder Mikropartikel umfasst, welche durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften aufgeschlossen werden, so dass mindestens ein eingeschlossener Inhaltsstoff und/oder gebundener Bestandteil der Mikrokapseln und/oder Mikropartikel freigesetzt wird und direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.
43. Zusammensetzung, umfassend alle für die Erzeugung eines Signals erforderlichen Komponenten sowie gegebenenfalls ein flüssiges Medium oder eine Matrix, dadurch gekennzeichnet, dass erst durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln auf die Zusammensetzung ein Signal entstehen kann.
44. Zusammensetzung nach Anspruch 43, umfassend ein Kollektiv oder mehrere Kollektive von Mikrokapseln und/oder Mikropartikeln, welche durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln aufschließbar sind, in einem flüssigen Medium oder in einer Matrix, wobei die Zusammensetzung alle für die Erzeugung eines Signals erforderlichen Komponenten in den Mikrokapseln/partikeln und/oder in dem Medium oder der Matrix enthält, wobei jedoch mindestens eine für die Signalerzeugung erforderliche Komponente in dem/n Mikrokapsel- oder Mikropartikel-Kollektiv/en so eingeschlossen ist, das erst nach Freisetzung dieser Komponente durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln ein Signal entstehen kann.

45. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 43{und 44}zum Nachweis der Manipulation eines mit dieser Zusammensetzung markierten Objekts.

Aktenzeichen: PCT/EP03/07534

Anmelder: SENSION BIOLOGISCHE DETEKTIONS- UND ...

PCT1896HV015wie

22.12.2004

Neue Patentansprüche:

41. Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts, **dadurch gekennzeichnet**, dass durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.
42. Nachweisverfahren nach Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und Lösungsmitteln auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.
43. Nachweisverfahren nach Anspruch 41 und 42, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Marker Mikrokapseln und/oder Mikropartikel umfasst, welche durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften aufgeschlossen werden, so dass mindestens ein eingeschlossener Inhaltsstoff und/oder gebundener Bestandteil der Mikrokapseln und/oder Mikropartikel freigesetzt wird und direkt oder indirekt ein spezifisches Signal erzeugt.
44. Zusammensetzung nach Anspruch 43, umfassend ein Kollektiv oder mehrere Kollektive von Mikrokapseln und/oder Mikropartikeln, welche durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften aufschließbar sind, in einem flüssigen Medium oder in einer Matrix, wobei die Zusammensetzung alle für die Erzeugung eines Signals erforderlichen Komponenten in den Mikrokapseln/Partikeln und/oder in dem Medium oder der Matrix enthält, wobei jedoch mindestens eine für die Signalerzeugung erforderliche Komponente in dem/n Mikrokapsel- oder Mikropartikel-Kollektiv/en so eingeschlossen ist, das erst nach Freisetzung dieser Komponente durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften ein Signal entstehen kann.

45. Zusammensetzung nach Anspruch 44, **dadurch gekennzeichnet**, dass, erst durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und Lösungsmitteln auf die Zusammensetzung ein Signal entstehen kann.
46. Zusammensetzung nach Anspruch 44 und 45, umfassend ein Kollektiv oder mehrere Kollektive von Mikrokapseln und/oder Mikropartikeln, welche durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften aufschließbar sind, in einem flüssigen Medium oder in einer Matrix, wobei die Zusammensetzung alle für die Erzeugung eines Signals erforderlichen Komponenten in den Mikrokapseln/Partikeln und/oder in dem Medium oder der Matrix enthält, wobei jedoch mindestens eine für die Signalerzeugung erforderliche Komponente in dem/n Mikrokapsel- oder Mikropartikel-Kollektiv/en so eingeschlossen ist, das erst nach Freisetzung dieser Komponente durch die Einwirkung von mechanischen Scherkräften und/oder Lösungsmitteln ein Signal entstehen kann.
47. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 44 bis 46 zum Nachweis der Manipulation eines mit dieser Zusammensetzung markierten Objekts.

45. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 43 und 44 zum Nachweis der Manipulation eines mit dieser Zusammensetzung markierten Objekts.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Januar 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/007759 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/28, 1/40(74) Anwalt: VOGELSANG-WENKE, Heike; Grünecker,
Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, Maximil-
ianstrasse 58, 80538 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007534

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juli 2003 (11.07.2003)(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 31 435.7 11. Juli 2002 (11.07.2002) DE(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): SENSION BIOLOGISCHE DETEKTIONS- UND
SCHNELLTESTSYSTEME GMBH [DE/DE]; Am
Mittleren Moos 48, 86167 Augsburg (DE). SCHWARZ
DRUCK GMBH & CO. KG [DE/DE]; Industriestrasse
6, 83734 Hausham (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHNEIDER, Pe-
ter [DE/DE]; Falkenstrasse 6, 86391 Stadtbergen (DE).
PAECH, Eberhard [DE/DE]; Albrecht Duerer Ring 14,
83607 Holzkirchen (DE). KREY, Christian [DE/DE];
Raslweg 4, 83734 Hausham (DE).Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IDENTIFICATION METHOD FOR VERIFYING THE AUTHENTICITY OF AN OBJECT

(54) Bezeichnung: NACHWEISVERFAHREN ZUR PRÜFUNG DER ORIGINALITÄT EINES OBJEKTS

(57) Abstract: The invention relates to an identification method for verifying the authenticity of an object during which the action of human saliva or constituents contained therein upon a marker, which is bound to the object or contained therein, generates a specific signal, whereupon this signal is evaluated.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren zur Prüfung der Originalität eines Objekts, bei dem durch die Einwirkung von humanem Speichel oder darin enthaltenen Bestandteilen auf einen Marker, der mit dem Objekt verbunden bzw. in ihm enthalten ist, ein spezifisches Signal erzeugt und dieses Signal ausgewertet wird.

WO 2004/007759 A2